



TITLE:

Kinetic and Chemical Properties of $[60]\text{Co}$ γ -Ray Irradiated Subtilisin BPN' in Aqueous Solution(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Otsuki, Kozo

CITATION:

Otsuki, Kozo. Kinetic and Chemical Properties of $[60]\text{Co}$ γ -Ray Irradiated Subtilisin BPN' in Aqueous Solution. 京都大学, 1970, 理学博士

ISSUE DATE:

1970-07-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/213454>

RIGHT:

【 24 】

氏 名	大 槻 耕 三 おお つき こう ぞう
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 191 号
学位授与の日付	昭 和 45 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Kinetic and Chemical Properties of ^{60}Co γ-Ray Irradiated Subtilisin BPN' in Aqueous Solution (^{60}Co γ 線照射ズブチリシンBPN'の速度論的および化学的性質について)
論文調査委員	(主 査) 教 授 波多野博行 教 授 大杉治郎 教 授 香月裕彦

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質加水分解酵素 Subtilisin BPN'は275 個のアミノ酸残基からなる分子量27,600の単純タンパク質である。その一次構造はすでに決定されており、その活性中心にはセリン及びヒスチジンが含まれていることが明らかにされている。この酵素にはシスチンやシステイン残基が含まれていない非 SH 酵素であるので、SH 基に対する放射線の特異的な作用は考えないで、一般のタンパク質分子の酵素作用に対する放射線の作用機構を放射線化学的に研究した。

この酵素の0.1% 水溶液に ^{60}Co γ 線を照射するとカゼインを基質とした場合のタンパク質分解活性と N-ベンゾイルアルギニンエチルエステル (BAEE) あるいは N-アセチルチロシン エチルエステル (ATEE) を基質とした場合のエステル分解活性との減少が異なることを見出した。またエステル分解活性については ATEE を基質とした場合の活性の減少は BAEE を基質とした場合に比べて著しく大きいことを見出した。これらの点を明らかにするために95~166krad の γ 線を照射した subtilisin の ATEE と BAEE とに対する反応速度論的パラメーターを Lineweaver-Burk の plot により求めた。その結果、BAEE に対するミハエリス定数 K_m には大きな変化が見出されなかったが、最大速度 V_{max} は照射により減少し、ATEE に対しては V_{max} は減少し K_m が増加することが見出された。これは照射 Subtilisin の BAEE や ATEE に対する触媒活性の能率は低下しているが、ATEE に対しては酵素と基質との結合の親和性が減少するものと解釈することができる。

この結果をさらに化学的に確かめるために照射酵素のアミノ酸分析を行なってその組成を明らかにした結果、照射酵素においては特にチロシン、トリプトファン、メチオニンの損失が著しいことが認められた。これら三種のアミノ酸はいずれも比較的水溶性であって、前述の速度論的な検討の結果と考え合わせると、この損失が phenol 核を有する基質 ATEE と酵素との結合の親和性に影響を与えたものと考えることができる。

また酵素タンパク質中におけるアミノ酸残基の存在状態を明らかにするために、ジアゾー 1-H- テトラ

ゾール (DHT) を用いて照射酵素のチロシン残基を化学的に修飾した結果、照射Subtilisinのチロシン残基の存在状態は照射により大きく変化し本来の高次構造が崩壊していることが示された。さらにこの高次構造の変化を α -キモトリプシンによる消化に対する挙動によって検討したところ、 γ 線を照射したSubtilisinは熱変性を行なった Subtilisinと同じように消化されやすくなっていることが明らかとなった。

以上の結果、チロシン、トリプトファンおよびメチオニン残基の破壊や存在状態の変化などの放射線損傷に起因する酵素タンパク分子の変性がBAEE およびATEE に対する酵素の触媒活性の能率の低下の原因になっていることを明らかにすることができた。

参考論文その1はSubtilisinBPN'をN-ブROMOコハク酸イミドで化学修飾しチロシンとメチオニンの残基が活性に関与していることを示した。

参考論文その2はSubtilisin BPN'をジアゾ-1-H-テトラゾール (DHT) で化学修飾し1個のヒスチジン残基がこの活性中心に含まれていることを示した。

参考論文その3はSubtilisin BPN'のカゼイン、ATEE、BAEEそれぞれの分解活性が放射線の照射によって異なった割合で失われることを見出した。

参考論文その4はタンパク質を構成するアミノ酸のアルカリ加水分解による自動分析法を確立したものである。

論文審査の結果の要旨

生体に対する放射線影響の研究は古くからいろいろな立場から行なわれてきたが、酵素という生物活性をもつタンパク質の活性発現の機構とそれに対する放射線の化学的作用機構に関する研究は放射線化学あるいは放射線生化学において最も基礎的な課題であると考えられる。

申請者はタンパク質分解酵素 Subtilisin BPN'を用いて水溶液における $^{60}\text{Co}\gamma$ 線の照射によるこの酵素分子の損傷とその際に起る酵素活性の変動について、放射線化学の立場から研究した。この酵素は分子量27,600の比較的小さい分子で275個のアミノ酸残基からなる単純タンパク質である。その一次構造はすでに決定されていて、その活性中心にセリンとヒスチジンが含まれていることが明らかされている。この酵素はシスチンやシステイン残基を含まない非SH酵素であるから、放射線的作用が特異的なSH基に関する特別の考慮はこれを除外して考えることができ、一般の酵素タンパク質分子に対する放射線的作用機構を取扱うのにきわめて適当な酵素であるといえる。

申請者はこの酵素が水溶液中で放射線の照射を受けて失活する際、カゼインを基質とするタンパク質分解活性とN-ベンゾイルアルギニンエチルエステル (BAEE) やN-アセチルチロシンエチルエステル (ATEE) を基質とするエステル分解活性とでその失活が全く趣きを異にしていることを見出し、またエステル分解活性についてもBAEEとATEEとでその失活の様子が異なっていることを見出した。本申請論文は、これらの点を明らかにするために反応速度論的な解析を行ないそのパラメーターの値を検討した結果、照射によるKmの変化は基質による差はなくVmaxの変化に差があることが見出された。この結果は酵素と基質との結合の親和性と酵素の触媒活性の能率との変化と解釈することができる。

この結果をさらに化学的に確かめるために照射した酵素タンパク質のアミノ酸分析を行なってチロシ

ン、トリプトファン、メチオニンの損失が著しいことを見出し、また酵素タンパク質中でのアミノ酸残基の存在状態を状態識別試薬を用いて検討してそのチロシン残基の存在状態の変化を証明し、さらに α -キモトリプシンによる消化に対する挙動を検討して照射酵素が熱変性を行なった Subtilisin と同じように消化されやすくなっていることを明らかにした。これらの結果から比較的疎水性の基が損傷をうけてフェノール核を有する基質との結合の親和性が変化しチロシン残基の存在状態の変化は高次構造の局部的崩壊を招来して放射線損傷の大きな原因となり酵素の触媒活性の能率の低下を来たしていると考えることができる。

要するに申請者は γ 線照射によって Subtilisin の触媒反応の進行が阻害を受けることを明らかにし、酵素のタンパク質のアミノ酸組成の変化とそのアミノ酸残基の存在状態の変化などと放射線による変性にもとづく基質に対する酵素の結合の親和性の喪失を証明して放射線失活の化学的機構を微細構造の面で明らかにしている。このような申請者の論文は従来の研究を一步進めて微細構造に立ち入ってその失活の機構を明らかにしたもので、またそのすぐれた着想のもとに困難な実験を成功させたもので、放射線化学、放射線生化学の分野に貢献するところが少なくない。また主論文および参考論文を通じて申請者が生物化学、物理化学および放射線化学に豊富な知識と優れた研究能力とを有することを認めることができる。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。